

保幼激素类似物对斜纹夜蛾核型多角体病毒在宿主血淋巴中增殖动态的影响

刘永平^{1,2}, 王方海¹, 苏志坚³, 李广宏^{1,*}, 庞 义¹

(1. 中山大学昆虫研究所/生物防治国家重点实验室, 广州 510275;

2. 中北大学化工与环境学院, 太原 030051; 3. 暨南大学药学院, 广州 510632)

摘要: 通过研究保幼激素类似物(juvenile hormone analogues, JHA) methoprene 对斜纹夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpNPV)在宿主血淋巴中增殖的影响, 以探明 JHA 促进 SpNPV 增殖的初步机制, 为阐明 JHA 促进病毒增殖提供更全面的理论依据。应用 SDS-PAGE 及 Western blot 法, 分析了 methoprene 对 SpNPV 多角体蛋白(polyhedron, POLH) 在宿主斜纹夜蛾 6 龄幼虫血淋巴中合成的影响。结果表明: 经 methoprene 处理后 2~3 天可明显促进幼虫血淋巴液中 POLH 的合成。在此基础上, 通过荧光定量 PCR 检测, 发现 methoprene 对 SpNPV 在幼虫血淋巴液复制的影响主要发生在处理后的第 4 和第 5 天, 该期间 *polh* 基因的拷贝数比对照显著增加, 拷贝数的峰值达 1.22×10^{10} /mL。

关键词: 斜纹夜蛾; 保幼激素类似物; 斜纹夜蛾核型多角体病毒; 增殖; 血淋巴

中图分类号: Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2007)04-0343-06

Effect of the juvenile hormone analogue methoprene on multiplication of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus in the host hemolymph

LIU Yong-Ping^{1,2}, WANG Fang-Hai¹, SU Zhi-Jian³, LI Guang-Hong^{1,*}, PANG Yi¹ (1. Institute of Entomology, State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 2. College of Chemical Engineer and Environment Sciences, North University of China, Taiyuan 030051, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Juvenile hormone analogues (JHA) can promote multiplication of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpNPV). The effect of methoprene on synthesis of polyhedrin in the hemolymph of the 6th instar larvae of the host *S. litura* was studied by using SDS-PAGE and immunoblot methods. The results showed that the synthesis of polyhedrin in the host hemolymph was promoted in 2–3 days post treatment. The effect of methoprene on replication of SpNPV-*polh* in hemolymph of the 6th instar larvae was investigated by real-time quantitative PCR. The results showed that replication of SpNPV-*polh* was promoted significantly from the 4th day to the 5th day post methoprene treatment, during which *polh* copies increased to 1.22×10^{10} copy/mL.

Key words: *Spodoptera litura*; juvenile hormone analogue; SpNPV; multiplication; hemolymph

斜纹夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpNPV)是一种能有效防治斜纹夜蛾幼虫的病原微生物。经多年研究, 我国已率先成功研制了 SpNPV 杀虫剂可湿性粉剂“虫瘟一号”, 并实施了产业化生产(陈其津等, 1998)。但在生产过程中, 如何进一步提高 SpNPV 的增殖效率,

降低生产成本, 仍然是该病毒生产过程中亟待解决的问题。我们利用保幼激素类似物(juvenile hormone analogues, JHA) methoprene(又名 ZR-515)处理斜纹夜蛾幼虫, 不仅有效延长了幼虫虫期, 还建立了在幼虫末龄进行病毒感染的方法, 从而显著提高了病毒的增殖效率(刘永平等, 2005)。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170628); 广东省科技攻关项目(2003C20509); 肇庆市科技项目(203301)

作者简介: 刘永平, 男, 1977 年生, 助教, 山西大同人, 研究方向为昆虫生理与病理学, E-mail: ypliu321@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lsslgh@mail.sysu.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-06-16; 接受日期 Accepted: 2007-04-02

有关 JHA 促进昆虫病毒增殖的机理研究目前尚少。Zhou 等(2002)研究发现外源保幼激素能显著提高家蚕核型多角体病毒极早期基因 *ie-1* 启动子携带的绿色荧光蛋白的转录水平。王厚伟等(2001)研究发现 ZR-515 不仅显著提高了 5 龄家蚕幼虫的体重,而且还显著提高了外源基因(植酸酶基因)在血淋巴中的表达量,并认为外源基因表达量的提高主要是在外源保幼激素作用下延长了外源基因的表达时间所致。刘永平等(2005)从消化生理角度研究了 JHA 促进昆虫病毒增殖的机理,结果证明 JHA 主要通过延长斜纹夜蛾幼虫历期,提高取食量和食物转化率而使病毒产量大幅度提高。本实验应用免疫印迹和荧光定量 PCR 法,通过检测 JHA 处理与未处理斜纹夜蛾末龄幼虫血淋巴中 *SplNPV* 多角体蛋白基因的复制与表达,以揭示 JHA 促进 *SplNPV* 增殖的机理,为今后广泛利用 JHA 高效、低成本增殖昆虫杆状病毒(尤其是杀虫速度加快的重组病毒)提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫: 斜纹夜蛾由中山大学昆虫研究所昆虫饲养室提供,为人工饲料饲养的健康幼虫。人工饲料按陈其津等(2000)的配方配制。饲养温度 27℃~28℃,光周期 12L:12D。

1.1.2 病毒: 斜纹夜蛾核型多角体病毒广州分离株,由中山大学昆虫研究所保存。

1.1.3 激素: 保幼激素类似物 methoprene,购自 Fluka 公司,用丙酮稀释至 1 μg/μL 备用。

1.1.4 主要试剂和仪器: 抗斜纹夜蛾核型多角体 POLH 蛋白兔抗体为中山大学昆虫研究所制备; DAB 显色试剂盒与羊抗兔 Ig-HRP 购自武汉博士德生物工程公司; 蛋白电泳仪为 BIO-RAD 公司的 Mini-PROTEAN® 3 Cell Instruction; 电转仪为 BIO-RAD 公司的 Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell Instruction; T 载体购自大连宝生物公司; 质粒抽提试剂盒购自上海申能博采生物科技有限公司; PCR 扩增仪为 Eppendorf 公司的 Mastercycler personal; 测序仪为 ABI 公司 3730 全自动测序仪; 荧光定量 PCR 仪 FTC 2000,由上海博亚公司提供。

1.2 方法

1.2.1 病毒感染与 JHA 处理: 均匀切取一定大小的饲料(使幼虫 8 h 内吃完),放入直径 3 cm 高 5 cm

的小塑料盒中,用微量加样器吸取斜纹夜蛾核型多角体病毒感染液(1×10^8 PIBs/mL)10 μL,均匀滴加于饲料表面,然后在每盒中接入末龄(6 龄)刚蜕皮幼虫 1 头(27 ± 1)℃下使其取食感染。待幼虫取食完感染病毒的饲料后,用微量注射器向每头幼虫体表滴加 methoprene 10 μL,并加入未感染病毒的饲料继续饲养。

1.2.2 幼虫血淋巴液的收集: 经 *SplNPV* 感染并用 methoprene 处理过的末龄幼虫,于 methoprene 处理后 6 h 开始收集血淋巴,以后每隔 24 h 取样一次,直至幼虫感染死亡为止。每个时间点取 6 头幼虫收集血淋巴,具体方法为:用昆虫针挑破幼虫第 2 腹足,使血淋巴流入预冷并加有 10 mmol/L DTT 的离心管中,置 -70℃ 保存备用。以同浓度病毒感染但未用 methoprene 处理的末龄幼虫作对照。

1.2.3 POLH 蛋白的 SDS-PAGE 检测: 从每天收集的血淋巴样品中取出 150 μL,于 800 r/min 离心 10 min,弃去上清液,在沉淀中加入 15 μL ddH₂O,再加入等量的 2×蛋白上样缓冲液混匀,于沸水中煮 5~10 min。上样前 3 000 r/min 离心 5 min,各样品的上样量为 10 μL,以低分子量蛋白为 Marker,按常规方法在 BIO-RAD 小型蛋白电泳仪上进行 SDS-PAGE。

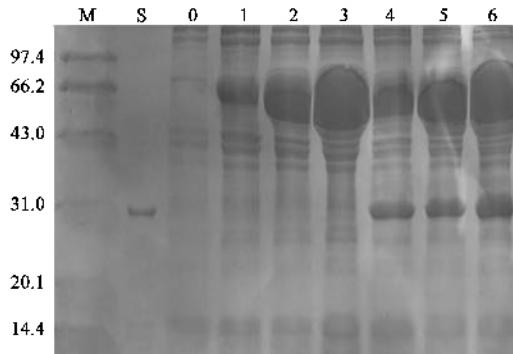
1.2.4 Western blot 检测: 样品经 SDS-PAGE 结束后,将凝胶置于电转仪中,以 100 V 或 350 mA 电泳 1 h 左右,使凝胶上的蛋白完全转移到 PVDF 膜上,按试剂操作说明进行免疫印迹,拍照。

1.2.5 常规 PCR 分析: (1)引物及探针的设计与合成:根据 *SplNPV* G2 株全序列中 *polh* 基因(GenBank 登录号:AF037262)的全长序列,应用 DNA-Star 和 Primer Express 设计 PCR 引物及 Taqman 探针,并由上海博亚生物公司合成。2 对 PCR 引物 1 对是外侧引物(*Splnpv-F*: 5'-TTATACTGCCTACAATTATACTCCCATC-3'; *Splnpv-R*: 5'-TGTATTCCGGCTGCAGGTTCA TC-3'),1 对为内侧巢式引物(*LYP-F*: 5'-CTAACACGAAACACGATGCT-3'; *LYP-R*: 5'-CTCGCCAGAAACTCTTAC-3')。探针:5'-FAM-TCGACAAGTATCTGCTCG CAGAGGATAMRA-3'。(2)常规 PCR 分析:将病毒基因引物分别与病毒处理组和未处理组幼虫血淋巴进行巢式 PCR 反应,以检测引物是否为特异性。预扩增反应体系为 50 μL,其中稀释 500 倍的血淋巴液 5 μL,上游引物(*Splnpv-F*)和下游引物(*Splnpv-R*)终浓度各为 0.4 μmol/L。反应流程:94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 45 s,15 个循环; 第 2 轮巢式 PCR 扩增反应体系 50 μL,其中第 1

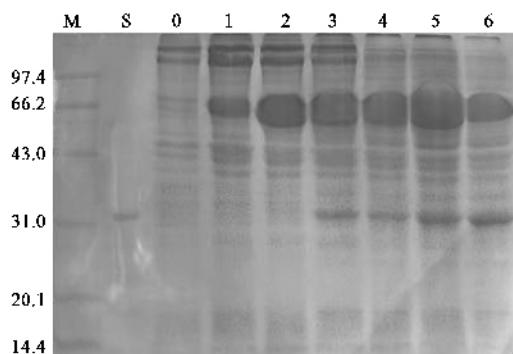
轮扩增产物 5 μ L, 上游引物 (LYP-F) 和下游引物 (LYP-R) 终浓度各为 0.4 μ mol/L。反应流程: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 45 个循环; 72℃ 延伸 5 min; 4℃ 保持。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测: (1) 荧光定量 PCR 实验: 应用绝对定量法, 以定量 PCR 仪自动生成的标准曲线对病毒进行定量。根据设计的巢式 PCR 引物进行 2 轮 PCR 实验。预扩增反应体系及反应流程同常规 PCR; 第 2 轮巢式 PCR 反应体系中多加入终浓度为 0.2 μ mol/L 的 Taqman 探针, 其他反应体系及反应流程同常规 PCR。实验设 3 次重复, 每重复测 3 次。

(2) 标准品制备: 将预反应的 PCR 产物割胶回收后连接于 T 载体, 对测序正确的载体测定 OD 值, 根据载体和克隆片段分子大小计算该质粒的摩尔浓度, 用双蒸水 10 倍稀释成 10^1 ~ 10^8 个拷贝/ μ L 的标准品, 荧光定量 PCR 选取 10^2 ~ 10^6 拷贝数作为模板构建标准曲线。PCR 反应同上。



a

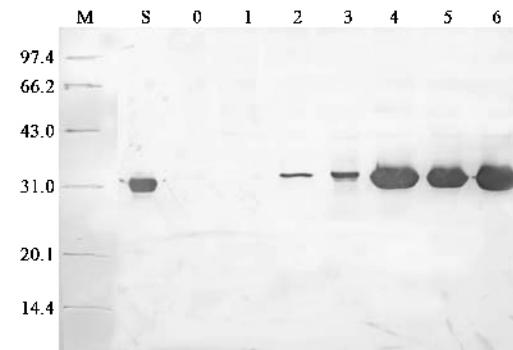


c

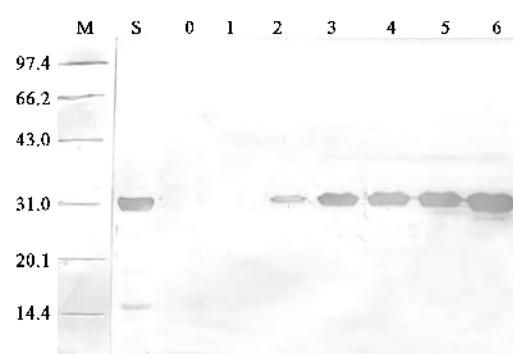
2 结果与分析

2.1 Methoprene 对 SplNPV 多角体蛋白在斜纹夜蛾血淋巴液中合成的影响

从图 1 可知: 在病毒感染 2 天后, 病毒处理组和病毒 + 激素处理组都可从免疫印迹图谱中见到明显多角体蛋白区带, 分子量约为 29 kDa (图 1:b, d)。图谱显示, 随感染时间的推移, 2 个处理组的多角体蛋白合成量均明显增加, 但增加方式不同。病毒处理组多角体蛋白在感染后的前 2~3 天合成量较少, 第 4 天显著增加, 第 5 天有所下降, 第 6 天再度增加; 病毒 + 激素处理组多角体蛋白的合成则随感染时间的延长而逐渐增加。免疫印迹结果表明, 与对照 (图 1:a, c) 相比, 保幼激素 methoprene 主要在感染前期 (即感染后的前 2~3 天) 促进了多角体蛋白的合成。



b



d

图 1 Methoprene 对多角体蛋白在感染 SplNPV 的斜纹夜蛾 6 龄幼虫血淋巴中合成的影响

Fig. 1 Effect of methoprene on polyhedrin synthesis in the hemolymph of the 6th instar larvae of *Spodoptera litura* infected with SplNPV
a: 病毒处理组 SDS-PAGE 图谱 (SDS-PAGE of virus group); b: 病毒处理组 Western blot 图谱 (Immunoblotting analysis of virus group); c: 病毒 + 激素处理组 SDS-PAGE 图谱 (SDS-PAGE of virus + methoprene group); d: 病毒 + 激素处理组 Western blot 图谱 (Immunoblotting analysis of virus + methoprene group); M: 蛋白质分子量标准 (Protein molecular weight marker); S: SplNPV 纯多角体蛋白 (阳性对照) (Pure SplNPV-POLH) (positive control); 0: 激素处理后 6 h (即病毒感染后 14 h) 样品 (Sample of 6 h post treatment by methoprene); 1~6: 分别为 0 取样点顺延 24 h 所取样品 (Samples every 24 h on 0 point base).

2.2 荧光定量 PCR 检测结果

2.2.1 血淋巴样品的常规 PCR 鉴定结果：病毒基因引物分别与病毒处理组和未处理组幼虫血淋巴样品进行 PCR 反应，结果见图 2。SpltNPV 的 *polh* 基因扩增片段与预期扩增片段大小一致，阴性对照未见扩增片段，说明所设计的 2 对引物特异性高，可以用于定量 PCR 扩增。同时表明，直接用血淋巴稀释液作 PCR 反应的模板是可行的，这样可省去提取病毒 DNA 的步骤并减少实验误差。

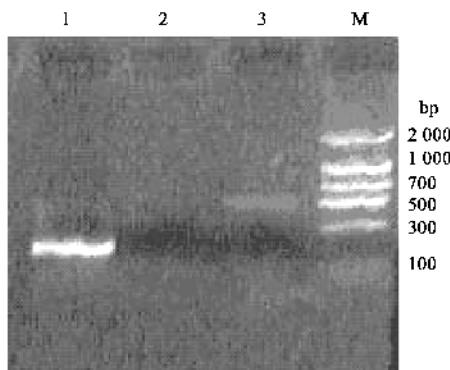


图 2 血淋巴样品中 SpltNPV-*polh* 的 PCR 扩增图谱

Fig. 2 PCR amplification profile of SpltNPV-*polh* in the hemolymph sample

1: 第 2 轮 PCR 产物，大小为 203 bp (203 bp of the first ring PCR amplification fragment); 2: 阴性对照 (Negative control); 3: 第 1 轮 PCR 产物，大小为 563 bp (563 bp of the first ring PCR amplification fragment); M: DNA 标准 (DNA marker DL2000)。

2.2.2 标准样品的实时荧光定量 PCR 结果：用各浓度的标准样品作定量 PCR，结果发现标准样品浓度在 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 个拷贝/ μL 时具有良好的灵敏度，并且样品含量范围多在 10^6 ~ 10^2 个拷贝/ μL 之间。因此测定样品时多采用 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 个拷贝/ μL 作为标准样品制作标准曲线。标准曲线如图 3 所示。

2.2.3 Methoprene 对 SpltNPV 基因组在宿主血淋巴中增殖动态的影响：感染了病毒的 6 龄初斜纹夜蛾幼虫，经 methoprene 处理，不同时段取样，血淋巴样品中的病毒基因组扩增曲线如图 4 所示。经统计分析，methoprene 处理后第 4 天与第 5 天病毒拷贝数显著增加，第 5 天达到峰值，含量为 1.22×10^{10} 个拷贝/ mL 。SpltNPV 在幼虫血淋巴中增殖的时序变化呈现双峰型，病毒处理组(对照组)与病毒 + 激素处理组(处理组)相比，后者第 2 个峰较第 1 峰的变化大。

3 讨论

3.1 Methoprene 对 SpltNPV 多角体蛋白在斜纹夜

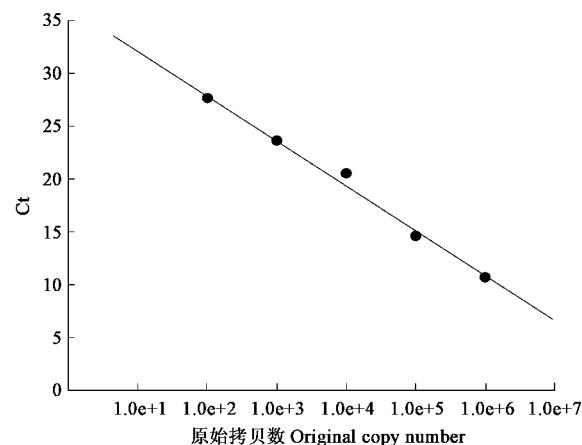


图 3 标准曲线及其斜率、截距和相关系数

Fig. 3 Linear standard curve and its slope, intercept and relative coefficient

$$y = -4.296 \log(x) + 36.604, R^2 = 0.9911.$$

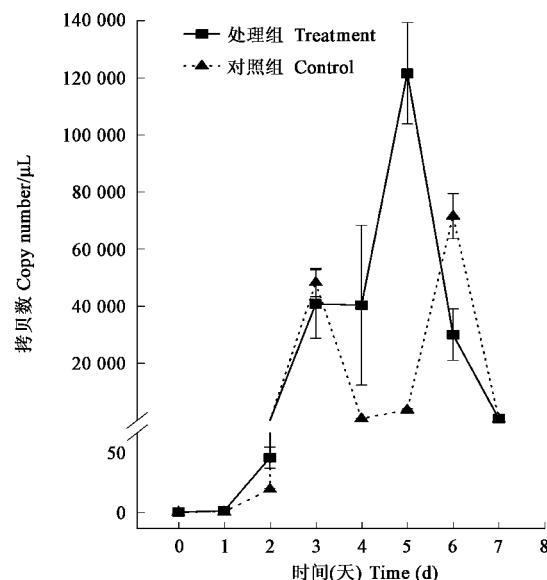


图 4 Methoprene 处理对 SpltNPV 基因组在感染 SpltNPV 的斜纹夜蛾 6 龄幼虫血淋巴中增殖变化趋势的影响

Fig. 4 Effect on trend of variation of genome of SpltNPV in the hemolymph of the 6th instar larvae of *Spodoptera litura* treated with methoprene

蛾血淋巴液中合成的影响

朱江等(2004)用 SpltNPV 感染斜纹夜蛾细胞，免疫印迹检测结果表明：病毒感染 24 h 即可见到明显的多角体蛋白区带，但有关病毒多角体蛋白在虫体内不同组织中的合成，尤其是保幼激素类似物对病毒多角体蛋白在虫体内不同组织中合成的影响尚未见报道。本实验结果表明，在血淋巴中 SpltNPV 多角体蛋白在病毒感染 2 天后才可检测到明显的杂交区带，而 methoprene 处理则可在病毒感染后的前 2~3 天明显促进多角体蛋白的合成。

polh 基因推导的读码框编码 249 个氨基酸,预测分子量约 29 kD (Pang *et al.*, 2001)。本实验结果显示:SDS-PAGE 及免疫印迹图谱上显示有 1 条主带,分子量在 29~31 kD 之间。原因可能是由于糖基化或者其他未明的原因,在电泳图上显示的实际大小有可能与理论值之间有显著性差异。另外,电泳的原因也存在 10% 的大小差异,还可能是因为凝胶的边缘效应或样品含量不同所致(吴敏等,2001),也可能像朱江等(2004)认为的一样与多角体的生产能力有关。

3.2 Methoprene 对 SpltNPV 复制的影响

Flipsen 等(1995)认为杆状病毒感染昆虫 20 h 后才在昆虫的血细胞或其他组织中发现感染,而吕颂雅等(2001)研究发现感染后 12 h 即可在棉铃虫的血细胞中观察到病毒粒子,我们的研究结果与第一种情况相符,即在感染后 20 h 后才在斜纹夜蛾幼虫血淋巴中检测到病毒拷贝。出现这种现象可能与吕颂雅等(2001)检测的是离体细胞,而我们检测的是活体细胞有关。姚勤等(2005)研究发现家蚕病毒粒子在血淋巴中增殖经历 3 个时期:即潜伏期、快速增长期和平台期。我们的实验未发现明显的平台期,SpltNPV 在斜纹夜蛾 6 龄幼虫血淋巴中的增殖呈现了 2 个相似的峰值,分别为感染后第 3 天和第 6 天。而 methoprene 处理后 SpltNPV 在血淋巴中的增殖呈现 1 个次峰和 1 个主峰,分别在感染后第 3 天与第 5 天。上述结果符合病毒二次感染的机理,二次感染主要发生在脂肪体、血细胞和真皮等组织。按二次感染的机理,处理组出现一个明显主峰(病毒粒子数多)的原因可能是为进一步感染其他组织作准备,造成基础病毒粒子的增多,从而促进病毒在虫体中的增殖。

杆状病毒的复制与增殖需要大量的蛋白因子和 RNA 参与。因此,宿主体内特定蛋白的表达及其表达量对病毒的增殖有一定影响。据报道保幼激素对蛋白质的合成有抑制作用,保幼激素能够抑制淀粉酶及蛋白质分解酶的活性,同时,也能够抑制家蚕后部丝腺细胞内自噬体和溶酶体的出现与数量,延缓细胞的瓦解,这与杆状病毒感染晚期对细胞的裂解作用相抗衡(牟志美等,1996)。保幼激素的这种双重作用的结果使得用其处理幼虫后,多角体蛋白基因前期的表达量稍低,但后期通过病毒的复制和表达时相的延长,使晚期多角体蛋白基因的表达量在短时间内迅速提高。值得一提的是,血细胞不仅是二次感染的靶细胞,同时它又有清除病毒的功能。

被感染的血细胞靠近马氏管,将吸收的病毒粒子传递给马氏管细胞,通过马氏管细胞,病毒进入马氏管腔,在这里,病毒蛋白衣壳被降解或排除体外(Begon *et al.*, 1993)。这也可成为解释在病毒感染后期处理组中的多角体蛋白含量并没有比对照组高的原因。

荧光定量 PCR 实验表明 methoprene 在病毒感染的后期能极显著地促进病毒基因组拷贝数增加,从而产生大量的病毒粒子。但病毒粒子增加是否多角体蛋白就增多呢?由于多角体内有多个病毒粒子,是否增加决定于两种水平上:病毒粒子(基因组数目)是否增加以及多角体总量是否增加。结合本实验结果分析表明:在血淋巴液中,病毒粒子的增加而多角体总量不会增加或者没有显著性差异(与对照组比较)。但粒子增多对病毒的复制也是有贡献的。

本实验只列出了幼虫血淋巴液的研究结果,其他组织如脂肪体等未能取得预期结果,因此还需作进一步研究才能更加全面的解释保幼激素类似物促进 SpltNPV 增殖的作用机制。

参 考 文 献(References)

Begon M, Haji Dayud KB, Young P, Howells RE, 1993. The invasion and replication of a granulosis virus in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*: an electron microscope study. *J. Invertebr. Pathol.*, 61: 281~295.

Chen QJ, Li GH, Pang Y, 2000. A simple artificial diet for mass rearing of some noctuid species. *Entomological Knowledge*, 37(6): 325~327. [陈其津,李广宏,庞义,2000. 饲养五种夜蛾科昆虫的一种简易人工饲料. 昆虫知识,37(6): 325~327]

Chen QJ, Pang Y, Li GH, 1998. Insecticide of SLNPV-No. 1. *J. Wuhan Univ. (Natural Science Edition)*, 44(Suppl.): 183. [陈其津,庞义,李广宏,1998. 斜纹夜蛾核型多角体病毒杀虫剂——虫瘟一号. 武汉大学学报(自然科学版), 44(杀虫微生物专刊): 183]

Flipsen JT, Martens JW, van Oers MM, Vlak JM, van Lent JW, 1995. Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. *Virology*, 208(1): 328~335.

Liu YP, Wang FH, Su ZJ, Li GH, Pang Y, 2005. Effect of juvenile hormone analogues on multiplication of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Acta Entomologica Sinica*, 48(6): 866~870. [刘永平,王方海,苏志坚,李广宏,庞义,2005. 保幼激素类似物对斜纹夜蛾核型多角体病毒增殖的影响. 昆虫学报,48(6): 866~870]

Lu SY, Yang FH, Liu ZQ, Qi YP, 2001. Infectious course of recombinant baculovirus marked with green fluorescent protein gene in larvae of cotton bollworm. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular*

Biology, 17(6): 743–750. [吕颂雅, 杨复华, 刘祖强, 齐义鹏, 2001. gfp 基因标记的重组杆状病毒对棉铃虫幼虫的侵染历程. 中国生物化学与分子生物学报, 17(6): 743–750]

Mu ZM, Cui WZ, Zhang YY, 1996. The effect of combination treatment of juvenile hormone and ecdysone on ultrastructure of silk-gland cell of *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 22(2): 125–127. [牟志美, 崔为正, 张友英, 1996. 保幼激素和蜕皮激素配合处理对家蚕后部丝腺细胞超微结构的影响. 蚕业科学, 22(2): 125–127]

Pang Y, Yu JX, Wang LH, Hu XH, Bao WD, Li G, Chen C, Han H, Hu SN, Yang HM, 2001. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology*, 287: 391–404.

Wang HW, Zhang ZF, Xiao QL, Li WG, He JL, 2001. Insect juvenile hormone enhancing gene expression in silkworm baculovirus vector system. *Chinese Journal of Biotechnology*, 17(5): 590–593. [王厚伟, 张志芳, 肖庆利, 李卫国, 何家禄, 2001. 昆虫保幼激素促进家蚕杆状病毒系统的基因表达. 生物工程学报, 17(5): 590–593]

Wu M, Xu XS, Wang XF, 2001. The purification and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis assay for the polyhedrin in *Philosamia cynthia ricini* nuclear polyhedrosis viruses. *J. Nanchang Univ. (Natural Science Edition)*, 25(4): 344–347. [吴敏, 徐旭士, 王晓芳, 2001. 蕈麻蚕核型多角体病毒包涵体蛋白的提纯及 SDS-PAGE 分析. 南昌大学学报(理科版), 25(4): 344–347]

Yao Q, Gao L, Chen KP, Hu ZG, 2005. Detection of proliferation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in its host by fluorescence quantitative PCR. *Acta Entomologica Sinica*, 48(6): 871–875. [姚勤, 高路, 陈克平, 胡志刚, 2005. 荧光定量 PCR 检测家蚕核型多角体病毒在其宿主体内增殖动态. 昆虫学报, 48(6): 871–875]

Zhou Y, Xiao Q, Zhang Z, He J, Zhang Y, 2002. Foreign insect hormones stimulating the transcription of the *ie-1* promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus *in vivo* and *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(7): 1488–1494.

Zhu J, Shen SD, Wang WB, Zhu YF, IKEDA Motoko, Hu ZL, Sheng Y, 2004. Proliferation characteristics of three Japanese strains of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus in cultural cells and sequence analysis of their polyhedrin genes. *Acta Entomologica Sinica*, 47(5): 543–550. [朱江, 沈颂东, 王文兵, 朱玉芳, 池田素子, 胡兆丽, 盛晔, 2004. 日本三株斜纹夜蛾核型多角体病毒的增殖特性及其多角体蛋白基因的序列分析. 昆虫学报, 47(5): 543–550]

(责任编辑: 黄玲巧)